

English Abstract for Japanese Patent Publication No.: 6-319583:

S1 1 PN="JP 6319583"

?t s1/9/1

1/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010139079 **Image available**

WPI Acc No: 1995-040330/199506

XRAM Acc No: C95-017746

of hepatitis C virus helicase gene in baculovirus - useful for large
scale prodn. of RNA helicase.

Patent Assignee: SOYAKU GIJUTSU KENKYUSHO KK (SOYA-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6319583	A	19941122	JP 92249241	A	19920918	199506 B

Priority Applications (No Type Date): JP 92249241 A 19920918

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6319583	A		9	C12P-021/02	

Abstract (Basic): JP 6319583 A

Prepn. of a helicase encoded by hepatitis C virus (HCV) comprises
introducing a HCV helicase gene into the non-essential region of a
baculovirus, transferring the baculovirus into an insect cell or larva
and recovering the expressed helicase.

USE/ADVANTAGE - The method can prepare RNA helicase in large
quantities.

Dwg.0/5

Title Terms: HEPATO; VIRUS; GENE; BACULOVIRUS; USEFUL; SCALE; PRODUCE; RNA

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12P-021/02

International Patent Class (Additional): C12N-015/51; C12N-015/86;

C12P-021/02; C12R-001-91

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-L0500E; B04-L05E; D05-C03C; D05-H17A3

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M720 M903 N133 N135 Q233 V500 V560 V802 V814

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-319583

(43)公開日 平成6年(1994)11月22日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02	Z N A	8214-4B		
// C 1 2 N 15/51				
15/86				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:91)				

審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平4-249241

(22)出願日 平成4年(1992)9月18日

(71)出願人 592198703

株式会社創薬技術研究所

福島県福島市松川町美郷四丁目1番地の1

(72)発明者 下遠野 邦忠

千葉県我孫子市下戸534-34

(72)発明者 土方 誠

東京都中央区佃2-21-11

(72)発明者 丹生谷 博

東京都江東区豊洲4-10-5-1306

(74)代理人 弁理士 本多 小平 (外3名)

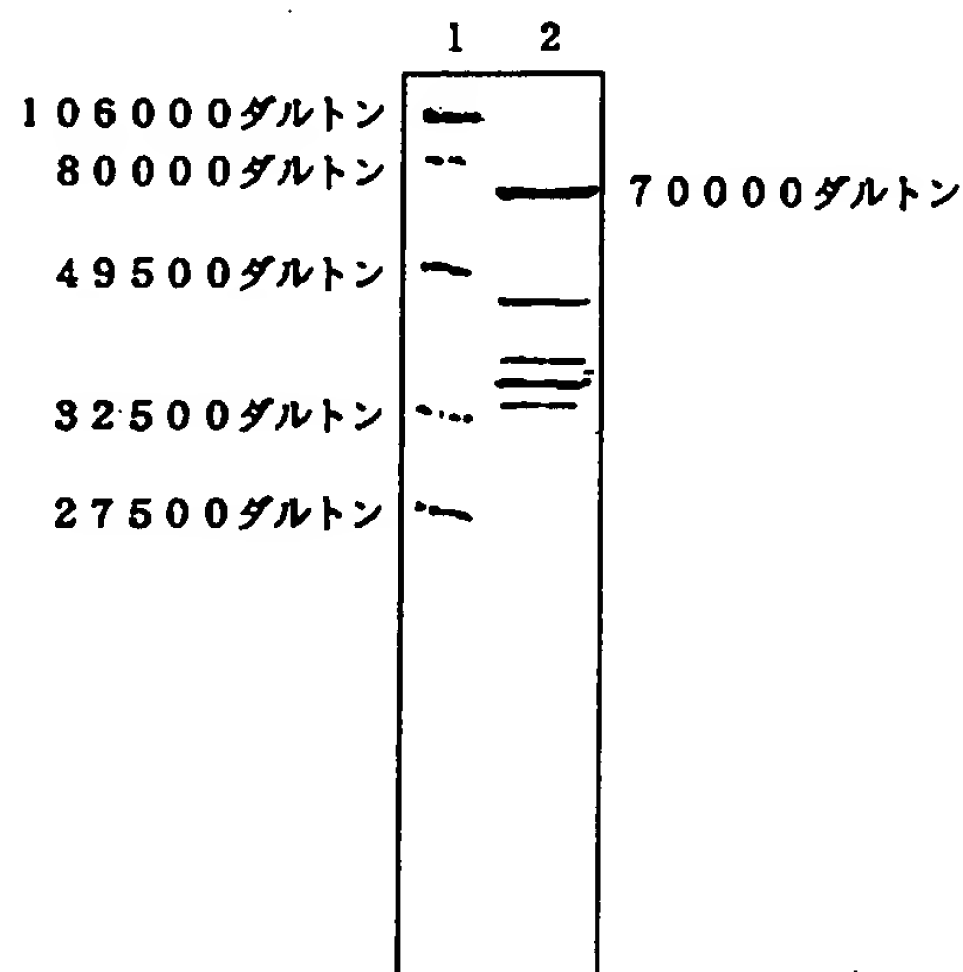
(54)【発明の名称】 C型肝炎ウイルスがコードするヘリカーゼ領域の製造方法

(57)【要約】

【目的】 C型肝炎ウイルスがコードするヘリカーゼ領域を含む蛋白質を大量に簡便に製造する方法を提供する。

【構成】 バキュロウイルスの増殖に非必須なゲノム領域に、C型肝炎ウイルスのコードするヘリカーゼ配列を持つ領域を含む遺伝子を組み込んだ組換えバキュロウイルスを、昆虫細胞あるいは昆虫の幼虫に感染させ、発現したヘリカーゼ配列領域を含む蛋白質を回収する。

第 6 図



1 分子量マーカー

2 組換えバキュロウイルスに感染させた Sf 9 細胞

【特許請求の範囲】

【請求項1】 バキュロウイルスの増殖に非必須なゲノム領域に、C型肝炎ウイルスのコードするヘリカーゼ配列を持つ領域を含む遺伝子を組み込んだ組換えバキュロウイルスを、昆虫細胞あるいは昆虫の幼虫に感染させ、発現したヘリカーゼ配列領域を含む蛋白質を回収することを特徴とするC型肝炎ウイルスがコードするヘリカーゼ領域の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は組換えバキュロウイルスを用いて、C型肝炎ウイルスの非構成蛋白質に存在するヘリカーゼ領域を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 C型肝炎ウイルスの遺伝子は輸血後に非A非B肝炎を起こした患者の血清をもとに、その一部が米国のカイロン社のホートンらによりクローニングされサイエンスに報告された (Science, Vol. 244, pp359-362, (1989))。また、日本では国立がんセンターの下遠野らによりクローニングされており、米国のカイロン社のホートンらによりクローニングされた物と遺伝子で22.6%の相違があり日本型のC型肝炎ウイルスとして報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87, pp9524-9528 (1990))。

【0003】 また、フラビウイルス、ベスチウイルスとの比較よりC型肝炎ウイルス遺伝子のコードする蛋白質の非構成蛋白質領域、アミノ酸1075番から1185番にセリンプロテアーゼの配列が、1200番から1500番にRNAヘリカーゼの配列が報告されている (加藤ら、FEBS Lett., Vol. 280, pp325-328, (1991))。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 C型肝炎ウイルスの非構成蛋白質の産生にはこのヘリカーゼ活性は必須であり、また当該ウイルスの複製にも必須であると考えられる。従って当該ヘリカーゼ活性の阻害剤は抗ウイルス作用を持つと考えられるため、その詳細な解析はC型肝炎ウイルスの感染予防および治療の観点から非常に重要である。

【0005】 その目的のため当該ヘリカーゼの性質の解析および阻害剤のスクリーニングのためにその大量に簡便な製造方法が必要である。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らはC型肝炎ウイルスの非構成蛋白質をコードする遺伝子のヘリカーゼ活性領域を、バキュロウイルスの増殖に非必須なゲノム領域に組み込んだ組換えバキュロウイルスを昆虫細胞あるいは昆虫の幼虫に感染させ、発現したヘリカーゼ領域を含む蛋白質を回収することにより本発明を完成した。

【0007】 本発明について組換えウイルスの作製に供されるウイルスはバキュロウイルスに分類されるものな

らばいかなるものでもよく、例えばオートグラファ・カルフォニカ (Autographa californica)、トリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni)、ラキプルシア・オウ (Rachiplusia ou)、ガレリア・メロネラ (Galleria mellonella)、あるいは、ボンピックス・モリ (Bombyx mori)、などがある。

【0008】 これらのウイルスの中でもオートグラファ・カリフォルニカは従来から広く研究されてきており、最適である。

10 【0009】 C型肝炎ウイルスの遺伝子は前述したように、米国のカイロン社のホートンらによりクローニングされた物、日本の国立がんセンターの下遠野らによりクローニングされた物など幾つか知られている。どれについても非構成蛋白質をコードする遺伝子の前半にRNAヘリカーゼ特有の配列が存在する。これらいずれの配列を用いても同様の結果が得られる。

20 【0010】 バキュロウイルスに組み込む非構造蛋白質のRNAヘリカーゼ配列の領域は、この非構造蛋白質の前半に存在する、グリシン-X-グリシン-リジンの配列、その数10個のアミノ酸の後に、アスパラギン酸-グルタミン酸-X-ヒスチジンの配列 (Xはある1個のアミノ酸) を含む領域であればよいが、好ましくはその領域の前後、数10個程度のアミノ酸を含む蛋白質領域が良い。

30 【0011】 具体的には、例えば下遠野ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87, pp9524-9528 (1990)) によりクローニングされた遺伝子の場合、少なくとも第1図~第4図に示されるアミノ酸1233番から1236番のグリシン-X-グリシン-リジンの配列、1316番から1319番のアスパラギン酸-グルタミン酸-X-ヒスチジンの配列を含む領域であればよいが、好ましくは1233番のグリシンの前10個のアミノ酸、1319番のヒスチジンの後10個のアミノ酸を含む蛋白質領域が良い。

40 【0012】 また、本発明において上記遺伝子と実質的に同一の機能を有する範囲において、修飾された遺伝子、即ち、塩基配列が置換、挿入、欠失したものでもよく、もちろん、実質的に同一の機能を有するかぎりアミノ酸配列が異なる程度に修飾されたものであってもよい。

【0013】 組換えウイルスの作成に当たっては、まずバキュロウイルスの増殖に非必須な遺伝子領域を組み込んだ第一の組換えベクターが作成される。

【0014】 この場合、前記領域にバキュロウイルス内で機能するプロモーターを存在させることが必要であり、さらにプロモーター下流に適当な制限酵素切断配列を有する合成リンカーを挿入することが好ましい。

50 【0015】 ここでいう増殖に非必須な遺伝子領域とは、例えばバキュロウイルスのポリヘドリン遺伝子 (L. K. ミラーら、Science, Vol. 219, pp715-721, (198

3)) など、外来性遺伝子の挿入による変異を受けても実質上ウイルスの増殖に影響を及ぼさない領域を言う。

【0016】また、バキュロウイルス内で機能するプロモーターとは、合成、天然を問わずバキュロウイルスが保有する転写の系でプロモーターとして有効に機能しえるものであればいかなる塩基配列のものでも良く、例えばバキュロウイルスのポリヘドリンをコードする遺伝子のプロモーターがあげられる。

【0017】本発明においては、第一の組み換えベクターのプロモーター下流にC型肝炎ウイルスの非構成蛋白質に存在するRNAヘリカーゼ領域を含む遺伝子配列を挿入して第二の組み換えベクターを作成する。挿入方法は、例えば第一のベクターのプロモーター下流に人為的に付与された制限酵素切断配列を利用して挿入すれば良い。次にバキュロウイルスの全ゲノムとこの第二の組み換えベクターを混合した後に、昆虫細胞にトランスフェクションにより導入し、ベクター遺伝子とウイルスゲノム遺伝子の間に相同組み換えを起こさせ、組み換えバキュロウイルスを構築する。ここで用いられる昆虫細胞はバキュロウイルスが増殖可能であればよく、例えばスポドプテラ・フルギベルダ(*Spodoptera furugiperda*)などがあげられる。

【0018】こうして得られた組み換えバキュロウイルスを感染しやすい昆虫細胞または昆虫の幼虫に感染させ、発現した蛋白質を回収する。感染に使用する昆虫細胞または昆虫の幼虫はバキュロウイルスが増殖可能であれば特に限定されないが、例えば細胞増殖の早い昆虫細胞のスポドプテラ・フルギベルダ(*Spodoptera furugiperda*)などが好ましい。

【0019】本発明によれば、バキュロウイルスの増殖に非必須な遺伝子領域にC型肝炎ウイルスのRNAヘリカーゼ配列を含む非構成蛋白質領域をバキュロウイルス内で機能するプロモーターと共に組み込まれた組み換えバキュロウイルスを得て、この組み換えウイルスを昆虫細胞または昆虫の幼虫に感染させ、蛋白質を発現させることにより大量に簡便に目的蛋白質を製造することができる。

【0020】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

【0021】実施例1

(1) C型肝炎ウイルスの非構成蛋白質領域に存在するRNAヘリカーゼ配列の領域を含む遺伝子を組み込んだ第二の組み換えベクターの作製(第5図を参照)

C型肝炎ウイルスの遺伝子の塩基3018番の制限酵素RsrIIサイトから塩基6049番の制限酵素SmaIサイトを切り出し(第1図~第4図を参照)、RsrIIサイト側に開始コドンのメチオニンを含むリンカー1を、SmaIサイト側にリンカー2をライゲーションし、結合した後リン酸化する。東洋紡績(株)製のベク

ターpTZ18UをEcoRI、HindIIIで切断し、切断したベクターを精製し脱リン酸化し、前述したリンカー1、2を結合したC型肝炎ウイルスの遺伝子とライゲーションをし、一度、大腸菌にトランスフォーメーションにより導入し増やす。

【0022】その得られたプラスミドを再度EcoRI、HindIIIで切断し、リンカー1、2を結合したC型肝炎ウイルスの遺伝子を得る。EcoRIサイト側にはリンカー3を、HindIIIサイト側には終始コドンを含むリンカー4をライゲーションし、結合した後リン酸化する。PHARMIGEN社製のバキュロウイルストランスファーベクターpVL941(第二の組み換えベクター)をBamHIで切断し、脱リン酸化し、前述したリンカー3、4を結合したC型肝炎ウイルスの遺伝子とライゲーションをし、一度、大腸菌にトランスフォーメーションにより導入し増やし第二の組み換えベクターを作製する。

【0023】(2) 組み換えバキュロウイルスの作製 PHARMIGEN社製のトランスフェクションキットBACULOGOLDを使用し、前述したバキュロウイルストランスファーベクターpVL941(第二の組み換えベクター)とバキュロウイルス遺伝子を混合し、スポドプテラ・フルギベルダ(*Spodoptera furugiperda*)の細胞Sf9に挿入する。このトランスフェクションキットのバキュロウイルス遺伝子はバキュロウイルストランスファーベクターと相同組み換えを起こさないとウイルスとして増殖できないようになっているため、相同組み換えを起こしたウイルスだけが得られる。

【0024】細胞に挿入して一週間程度の後、この組み換えウイルスを回収する。

【0025】(3) 組み換えバキュロウイルスによるC型肝炎ウイルスの非構成蛋白質に存在するヘリカーゼ配列領域の製造

得られた組み換えバキュロウイルスを細胞Sf9に感染させ、培養3日後に回収する。ウエスタンブロット法により発現蛋白質の確認を行った。

【0026】その結果、分子量約70000ダルトンの蛋白質を産生していることが判明した(第6図を参照)。C型肝炎ウイルス遺伝子のRsrIIサイトからSmaIサイトの領域には、その分子内に含まれるプロテアーゼにより切断される場所が2か所含まれており、RNAヘリカーゼ配列の領域は分子量70000ダルトンの蛋白質として産生されることが推定され、実際に発現した蛋白質と同一の分子量である。

【0027】ウエスタンブロット法に用いた抗血清は、下遠野らにより報告(Jpn. J. Cancer Res. Vol. 83, pp264-268, (1992))されている蛋白質07(塩基4224番から塩基4963番)により得られた抗血清を用いた。

【0028】

【発明の効果】本発明は、組換えバキュロウイルスを利

用することにより、大量に簡便にC型肝炎ウイルス遺伝子の非構成蛋白質に存在するRNAヘリカーゼの領域を製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】第1図は、C型肝炎ウイルス遺伝子(Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87, pp9524-9528(1990))の(その1)塩基1番～2591番を示す。

【図2】第2図は、同C型肝炎ウイルス遺伝子の(その2)塩基2592番～5183番を示す。

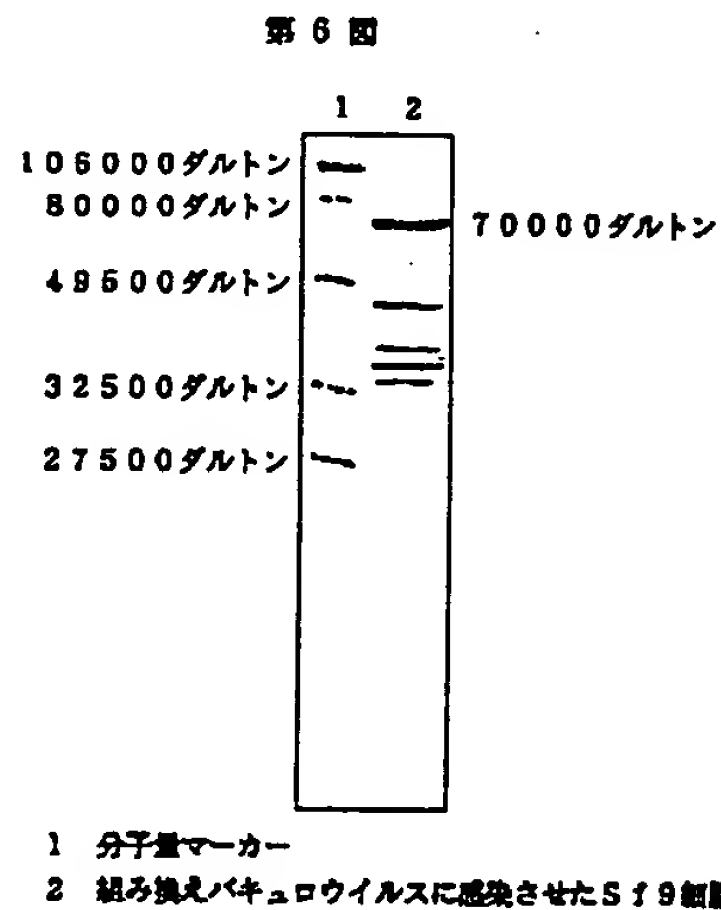
【図3】第3図は、同C型肝炎ウイルス遺伝子の(その3)塩基5184番～7775番を示す。

【図4】第4図は、同C型肝炎ウイルス遺伝子の(その4)塩基7776番～9413番を示す。

【図5】第5図は、C型肝炎ウイルスの非構成蛋白質に存在するセリンプロテアーゼ活性領域を含む遺伝子を組み込んだバキュロウイルストランスファクターpVL941(第二の組み換えベクター)の作製手順を示す。

【図6】第6図は、組み換えバキュロウイルスにより産生した蛋白質のウエスタンブロット法による結果を示す。

【図6】



[illegible]

【图 1】

(5)

【図4】

—1046—

【図5】

第5図

